

A549 细胞对单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒的摄取作用

丁建潮, 胡富强*, 袁 弘

(浙江大学 药学院, 浙江 杭州 310031)

摘要: 目的 考察单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒(monostearin solid lipid nanoparticles, MSLN)经 PEG2000 修饰后, 对 A549 细胞摄取 MSLN 及 J774Al 细胞吞噬 MSLN 的影响。方法 采用溶剂扩散法制备 MSLN, 测定其粒径和 zeta 电位; 以罗丹明 B(Rhodamine B) 为荧光标记物, 研究 A549 细胞对 MSLN 的摄取作用和 J774Al 细胞对 MSLN 的吞噬作用。结果 MSLN 的细胞毒性较低, A549 细胞对 MSLN 的摄取可快速接近饱和, 其摄取百分率与 MSLN 在细胞外的浓度呈负相关。结论 MSLN 经 PEG2000 修饰, 可显著抑制 J774Al 细胞对 MSLN 的吞噬, 但可增加 A549 细胞对 MSLN 的摄取。

关键词: 固体脂质纳米粒; A549 人 II 型肺上皮细胞; J774Al 巨噬细胞; 细胞摄取; 细胞吞噬

中图分类号: R943.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)11 - 0876 - 05

Uptake of monostearin solid lipid nanoparticles by A549 cells

DING Jian-chao, HU Fu-qi^{*}, YUAN Hong

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **Aim** To investigate the cellular uptake of monostearin solid lipid nanoparticles (MSLN) and the influence on the cellular uptake by MSLN modified with PEG2000 in human-type II cell alveolar epithelial cell line (A549) and murine macrophages cell line (J774Al). **Methods** MSLN were prepared by a novel solvent diffusion method. The particle size distribution and zeta potential of MSLN, measured by light scattering and electrophoretic mobility, were investigated. The cytotoxicity of MSLN and MTX-loaded MSLN in A549 cells were performed by the MTT method. Rhodamine B was incorporated into solid lipid nanoparticles as fluorescent marker, after PEG2000 integrating monostearin during preparation, the cellular uptake of MSLN by A549 and J774Al cell lines were determined spectrofluorimetrically. **Results** The IC₅₀ of MSLN and MTX-loaded MSLN on A549 cells were 227.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 71.37 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The percentage of cellular uptake showed a negative correlation to the concentration of MSLN in incubation medium and the internalization behaved rapidly. Contrary to situation in J774Al cell line, internalization of solid lipid nanoparticles was promoted with increasing the content of PEG2000 incorporated into MSLN in A549 cell line. **Conclusion** After modifying MSLN with PEG2000, it represents relative lower phagocytosis by J774Al cell line and higher uptake in A549 cell line.

Key words: solid lipid nanoparticles; human-type II cell alveolar epithelial cell line A549; murine macrophages cell line J774Al; cellular uptake; phagocytosis

以生理相容性较好的脂质为骨架材料, 制备固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN), 是近年

来继乳剂、脂质体和微球后, 研究十分活跃的靶向给药系统^[1]。SLN 比表面积大, 进入体内循环后, 易被单核吞噬系统作为异物吞噬, 这种吞噬作用与粒子的理化性质有关^[2]。减少纳米粒体内吞噬的主要策略是采用粒子表面物理修饰或化学键合亲水性分子, 如聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG), 以增加其表

收稿日期: 2004-02-12.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目资助(MB03817)。

通讯作者 Tel/ Fax: 86 - 571 - 87217327,

E-mail: pharmnet@cps.zju.edu.cn

面的亲水性,减少表面蛋白吸附^[3],延长体内循环时间。

细胞模型是研究药物吸收的重要技术手段,目前应用于药物(包括载体和给药系统)的常用细胞模型包括 Caco-2, HeLa, HL-60 和 A549 细胞等。不同的细胞模型,一般有不同的适用范围,如 Caco-2 主要用于肠吸收研究, A549 主要用于肺部吸收研究,而 HeLa 和 HL-60 则主要用于肿瘤模型细胞的吸收或摄取研究。本研究的后续目标是探讨单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒(monostearin solid lipid nanoparticles, MSLN)作为肺部给药系统的可行性,因此选择 A549 细胞作为细胞摄取研究用模型细胞。J774A1 巨噬细胞为鼠巨噬细胞的一种,是鼠单核吞噬系统的重要组成部分,常用于粒子的体内细胞吞噬研究,并已应用于固体脂质纳米粒(SLN)的相关吞噬作用研究^[4]。本研究继续选择 J774A1 巨噬细胞作为细胞吞噬研究用模型细胞,并采用溶剂扩散法制备单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒^[5],考察 MSLN 经 PEG2000 修饰前后,对 A549 细胞摄取 MSLN 及 J774A1 细胞吞噬 MSLN 的影响,探讨 MSLN 作为药物载体的潜在价值。

材料与方 法

材料与仪器 单硬脂酸甘油酯(上海化学试剂有限公司);罗丹明 B(上海试剂三厂);聚乙二醇 2000(上海浦东高南化工厂);RPMI Medium 1640,胰蛋白酶(Gibco, BRL Life Technology, Grand Island, NY, USA);HEPES, MTT(上海生工生物工程技术有限公司);超级新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。其他试剂均为分析纯。

激光粒度仪(Zetasizer 3000 HS, Malvern, UK),原子力显微镜(SPA3800N, SEIKO, Japan),高速离心机(3K30, SIGMA),24 孔板(Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA),荧光分光光度计(F4000, HITACHI, Japan),酶联免疫检测仪(DG3022A, 国营华东电子管厂),荧光倒置显微镜(Leica, DML)。

单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒的制备 取单硬脂酸甘油酯 80 mg,精密称定,置于丙酮 2 mL 和乙醇 2 mL 组成的有机相中,水浴 50 °C 溶解。以 0.2% 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA) (w/v) 溶液 40 mL 为分散相,置冰浴。在 400 r·min⁻¹ 机械搅拌下,将有机相加至分散相中,搅拌 5 min,得到 SLN 分散液。用 3 mol·L⁻¹ HCl 溶液调节混合体系 pH 至 1.2,得到 SLN 混悬液。混悬液以 25 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,所

得沉淀加适量蒸馏水超声(400 W, 60 次)分散,用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 至 7.0。

有机相中分别加入罗丹明 B 约 8 mg 或/和 PEG2000(4, 8, 24 和 72 mg),同法制备,沉淀用蒸馏水洗涤,除去游离的罗丹明 B。

有机相加入甲氨喋呤(methotrexate, MTX)约 1.0 mg,用 6 mol·L⁻¹ HCl 溶解,同法制备,沉淀用蒸馏水洗涤,除去游离药物。

纳米粒的粒径分布及表面电位测定 纳米粒混悬液加重蒸水稀释 20 倍,用激光粒度仪测定粒径及 zeta 电位。

原子力显微镜(AFM)观察 纳米粒形状及表面形态的表征仪器为 SPA3800N 型原子力显微镜,微悬臂长度为 180 nm,扫描针尖为商用氮化硅针尖,力常数约为 3.2 N·m⁻¹,成像模式为轻敲模式。

细胞毒性与细胞摄取研究

细胞培养 取人 II 型肺上皮细胞 A549,在含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中连续培养(5% CO₂, 37 °C 培养箱)。取对数生长期细胞,胰酶消化后,按细胞数 1 × 10⁵/孔接种于 24 孔板,培养箱内预培养 24 h。

取鼠巨噬细胞 J774A1,在含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养(5% CO₂, 37 °C 培养箱)。取对数生长期细胞,按细胞数 1 × 10⁵/孔接种于 24 孔板,培养箱内预培养 24 h。

细胞毒性测定 细胞毒性测定采用四唑盐比色法(MTT Assay)^[6]。预培养 24 h 细胞贴壁生长后,24 孔培养板分 6 组,每组 4 孔分别加入未经 PEG2000 修饰的 MSLN 混悬液(31.25, 62.5, 125, 250 和 500 μg·mL⁻¹ 及空白对照),另取一块板如上法加入未经 PEG2000 修饰的载甲氨喋呤的 MSLN 混悬液(2, 6, 12, 46, 92, 184, 368 和 736 μg·mL⁻¹ 及空白对照),培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 60 μL,孵育 4 h 后弃去上清液, PBS 溶液冲洗 2 次,每孔加入 DMSO 500 μL 终止反应。将培养板水平振荡 10 min,用酶联检测仪在 570 nm 处测定吸收度,按下式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = A_{570(\text{样品})} / A_{570(\text{对照})} \times 100\% \quad (1)$$

其中 $A_{570(\text{样品})}$ 为加入混悬液后的细胞吸收度, $A_{570(\text{对照})}$ 为空白对照的细胞吸收度。

荧光强度测定 24 孔培养板中的 A549 细胞经预培养贴壁生长后,分别加入含罗丹明 B 的 MSLN 和经 PEG2000 修饰的 MSLN 混悬液(单硬脂酸甘油

酯质量浓度分别为 2, 3, 5, 20, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于孵育 5, 15, 30, 60, 120 和 240 min 后, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 胰酶消化, 收集细胞, 荧光分光光度法测定细胞悬液荧光强度^[4]。摄取百分率按(2)式计算:

$$\text{摄取百分率}(\%) = F / F_0 \times 100\% \quad (2)$$

其中 F 为不同取样时间测得的细胞悬液荧光强度, F_0 为加至细胞悬液的 MSLN 初始荧光强度。

24 孔培养板中的 J774A1 细胞预培养后, 分别加入含罗丹明 B 的 MSLN 和经 PEG2000 修饰的 MSLN 混悬液(单硬脂酸甘油酯质量浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于孵育 5, 15, 30, 60, 120 和 240 min 后, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 收集细胞, 荧光分光光度法测定细胞悬液荧光强度。

24 孔培养板中的 A549 细胞贴壁生长后, 分别加入含罗丹明 B 的 MSLN 和经 PEG2000 修饰的 MSLN 混悬液(单硬脂酸甘油酯质量浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 孵育 15, 30 和 60 min 后, 用 PBS 冲洗细胞 3 次, 荧光倒置显微镜观察并拍照。

结果与讨论

1 纳米粒的粒径与表面电位

用激光粒度仪测得的 MSLN 粒径见表 1。不同 PEG 量修饰的 MSLN, 其体均粒径分布多数在 350 - 400 nm, 未见有明显的差异。测定结果表明, MSLN 带负电, zeta 电位在 - 20 mV 左右, 体系相对稳定。

在预实验中曾经采用 PEG500 和 PEG10000 作为修饰剂, 发现制得的纳米粒悬液的多分散系数比较大, 可能与这两种分子量的 PEG 在制备过程中的扩散行为有关, 具体原因有待进一步研究。

2 纳米粒的原子力显微镜照片

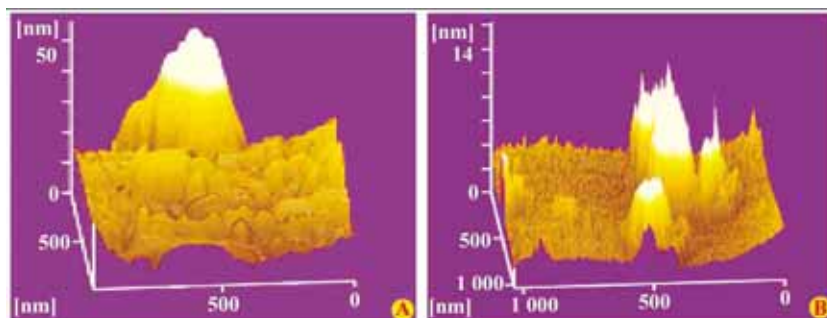
图 1A 为 MSLN 的 AFM 立体图, 图中的黄色亮斑即 MSLN 颗粒, 从图中可观察到颗粒表面比较光滑。图 1B 为经 PEG2000 修饰的 MSLN 的 AFM 立体图, 图中的黄色亮斑即为经 PEG2000 修饰的 MSLN 颗粒(+PEG 24 mg)。从图中可观察到颗粒表面有绒毛状突起, 表面粗糙度明显增加。这可能与纳米粒经 PEG2000 修饰后, 部分亲水性的 PEG2000 分子保留在纳米粒表面有关。

3 A549 细胞毒性试验

以 MTT 法测得的 A549 细胞活性结果显示, 随着纳米粒浓度的增加, A549 细胞存活率降低。采用线性回归法计算得到 MSLN 的 IC_{50} 为 227.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 显示出较低的细胞毒性。据报道^[5], 固体脂质纳米粒的细胞毒性与脂质基质、表面修饰剂的性质和纳米粒的浓度有关。测定结果显示, 抗肿瘤药物甲氨喋呤溶液对 A549 细胞的 IC_{50} 为 $77.65 \times 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而载药纳米粒混悬液的 IC_{50} 为 71.37 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明甲氨喋呤被包封入 MSLN 后, 可明显降低给药系统的细胞毒性, 其原因可能与固体脂质纳米粒转运进入细胞后, 水难溶性药物从这种载体中的缓慢释放有关^[5]。

Table 1 Average diameter, zeta potential and polydispersity index of MSLN loaded Rhodamine B

Nanoparticles tested Addition of PEG2000 / mg	Average diameter / nm			Polydispersity index	Zeta-potential / mV
	Mean	Width	Area		
0	406.2	80.2	100	0.166	- 21.1 \pm 1.1
4	373.5	247.0	100	0.172	- 19.6 \pm 0.6
8	350.7	232.2	100	0.113	- 20.2 \pm 0.5
24	406.3	169.9	100	0.196	- 18.9 \pm 0.6
72	388.5	206.5	100	0.156	- 18.6 \pm 0.5



A: PEG2000-free MSLN; B: PEG2000-modified MSLN

Figure 1 Atomic force microscopy images of monostearin solid lipid nanoparticles (MSLN)

4 J774 A1 巨噬细胞吞噬试验

研究结果显示, MSLN 可被 J774 A1 巨噬细胞快速吞噬, 5 min 吞噬百分率达到 92.2%, 此后趋于平缓。经 PEG2000 修饰的 MSLN (PEG2000 分别以 8, 24 和 72 mg 修饰单硬脂酸甘油酯 80 mg), 5 min 相应的吞噬百分率只有 10.11%, 7.16% 和 7.23%, 4 h 内吞噬百分率变化不大, 表明 PEG2000 可明显抑制巨噬细胞对 MSLN 的吞噬。有报道^[3]认为, 纳米粒经 PEG 修饰, 可改善纳米粒的亲水性, 减少巨噬细胞对其的识别而避免大量吞噬。

5 A549 细胞摄取荧光照片

MSLN 与经 PEG2000 修饰的 MSLN 被 A549 细胞摄取的荧光照片见图 2, 红色斑点即为摄入了含罗丹明 B 标记的纳米粒后的 A549 细胞。研究结果显示, 这两种纳米粒被 A549 细胞摄取的速率存在较大的差异, 1 h 时, 经 PEG2000 修饰的 MSLN (图 2B) 的色泽明显深于未修饰的 MSLN (图 2A), 表明 PEG2000 的修饰能促进 A549 细胞对 MSLN 摄取。这一结果正好与巨噬细胞吞噬实验结果相反。对于相同的 PEG2000 修饰, 在 A549 细胞的摄取作用和 J774 A1 巨噬细胞吞噬作用之间可能存在着不同的机制。

6 A549 细胞摄取试验

图 3 显示了 PEG2000 修饰对 MSLN 的 A549 细胞吞噬作用的影响。于不同的孵育时间, 采用 PEG 修饰的纳米粒, 其 A549 细胞的摄取量均高于未修饰的 MSLN ($P < 0.01$)。当 80 mg 单硬脂酸甘油酯在制备过程中采用 24 mg PEG2000 修饰时, 在 5, 30, 60, 120 和 240 min, 其摄取量分别比未用 PEG 修饰的 MSLN 增加了 2.14, 1.85, 1.88, 2.08 和 2.24 倍。采用 4 mg 或 8 mg PEG2000 修饰 MSLN, 也得到了类似的结果, 并显示随着 PEG2000 修饰量的增加

摄取量也随着增加的趋势。有报道^[2]认为, 纳米粒表面经 PEG 修饰, 可改善纳米粒的表面特性, 增加与细胞膜作用的亲和力; 存在于纳米粒表面上的 PEG2000, 增加了纳米粒与靶细胞膜双分子层之间的“相溶性”, 促进纳米粒转运进入细胞。实验结果与本研究的目标相一致, 为后续的体内研究奠定了基础。

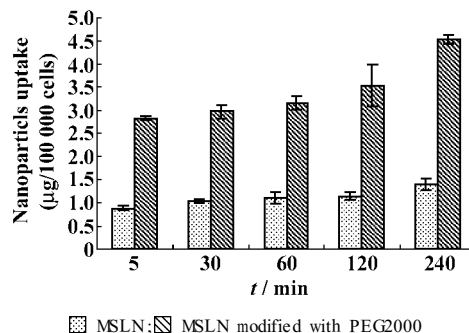
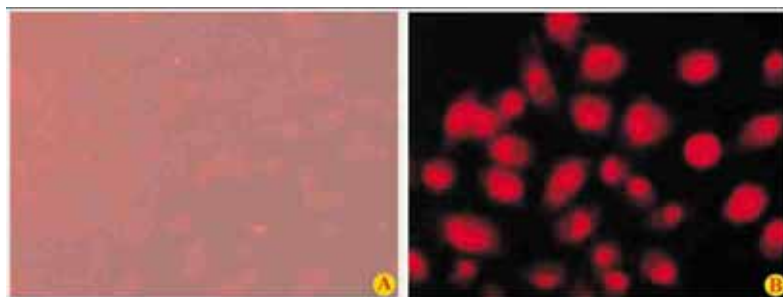


Figure 3 Uptake of PEG2000-free MSLN and MSLN modified with 24 mg PEG2000 in A549 cell line at a dosing concentration of $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

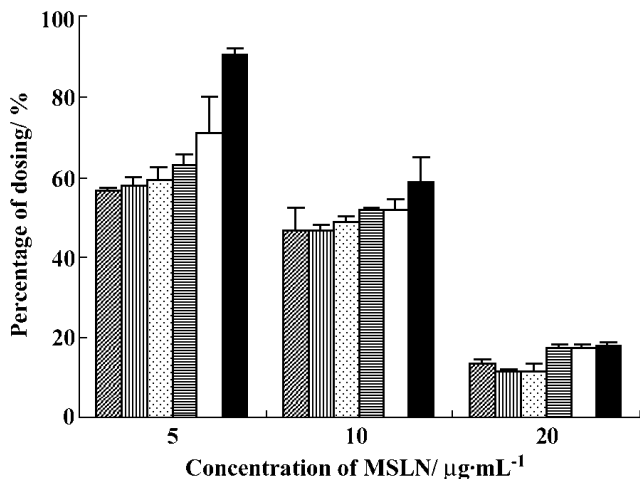
A549 对于不同浓度 MSLN (含有相同浓度 PEG2000, 24 mg) 的摄取试验结果见图 4。结果显示, A549 细胞对 MSLN 的摄取与纳米粒在孵育介质中的浓度及孵育时间相关。A549 细胞摄取百分率随着 MSLN 在孵育介质中浓度的增加而逐渐下降 ($P < 0.01$), 揭示单位时间内 A549 细胞对于纳米粒的摄取量存在一个限值。

对于低浓度的 MSLN, A549 细胞摄取随着孵育时间的增加而增加; 对于较高浓度的 MSLN, 孵育时间对于 A549 细胞摄取的影响并不显著。总体上看, A549 细胞对于经 PEG2000 修饰的 MSLN 的摄取作用较快, 5 min 已有大量的 MSLN 被细胞摄取, 其摄取速率明显高于类似的报道^[7,8], 提示 MSLN 可应用于靶向细胞的药物载体。



A: PEG2000-free MSLN; B: PEG2000-modified MSLN

Figure 2 Fluorescent staining of cellular uptake of monostearin solid lipid nanoparticles after incubation with A549 cell for 1 h



▨ 5 min; ▤ 15 min; ▧ 30 min; ▩ 60 min; □ 120 min; ■ 240 min

Figure 4 Uptake of MSLN modified with 24 mg PEG2000 in A549 cell line. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

结论

采用溶剂扩散法制得了单硬脂酸甘油酯固体脂质纳米粒,这种纳米粒的粒度分布均匀,细胞毒性低,具有较好的生理相容性。以单硬脂酸甘油酯为主要组成的固体脂质纳米粒,其 A549 细胞的摄取速度较快;经 PEG2000 修饰,可明显减少巨噬细胞的吞噬,但可显著增加 A549 细胞的摄取,是一种有前途的纳米药物载体。

References :

[1] Müller RH, Müder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles

(SLN) for controlled drug delivery — a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm* , 2000 ,**50**(1) :161 - 177 .

[2] Zhang Y, Kohler N, Zhang MQ. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake [J]. *Biomaterials* , 2002 ,**23**(7) :1553 - 1561 .

[3] Gessner A, Waicz R, Lieske A, *et al*. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities influence on plasma protein adsorption [J]. *Int J Pharm* , 2000 ,**196**(2) :245 - 249 .

[4] Bocca C, Cavalli R, Gabriel L, *et al*. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles [J]. *Int J Pharm* , 1998 ,**175**(2) :185 - 193 .

[5] Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, *et al*. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization [J]. *Int J Pharm* , 2002 ,**239**(1 - 2) :121 - 128 .

[6] Schoer N, Hahn H, Müller RH, *et al*. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages [J]. *Int J Pharm* , 2002 ,**231**(2) :167 - 176 .

[7] Davda J, Labhassetwar V. Characterization of nanoparticles uptake by endothelial cells [J]. *Int J Pharm* , 2002 ,**233**(1 - 2) :51 - 59 .

[8] Kristl J, Volk B, Ahlin P, *et al*. Interaction of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR [J]. *Int J Pharm* , 2003 ,**256**(1 - 2) :133 - 140 .